ÜBER

# DEN URSPRUNG DER CITRONENSÄURE ALS BESTANDTEIL DER MILCH.

---

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE,

VORGELEGT

DER HOHEN PHILOSOPHISCHEN FACULTÄT

DER

UNIVERSITÄT ERLANGEN

VON

ANTON SCHEIBE

AUS

MÜNCHEN.

---

(SONDERABDRUCK AUS DEN LANDWIRTSCHAFTL. VERSUCHS-STATIONEN, BD. XXXIX.)

MERSEBURG.
BUCHDRUCKEREI VON FRIEDRICH STOLLBERG.
1891.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535708_0196

Die von Th. Henkel im hiesigen Laboratorium gefundene auffallende Thatsache, dass die Citronensäure ein normaler Bestandteil der Kuhmilch ist, legt die folgenden Fragen nahe, welche der Entdecker unbeantwortet liess:

1. Ist die Citronensäure auch in anderer als Kuhmilch enthalten?

2. Woher stammt die Citronensäure der Milch?

In der vorläufigen Mitteilung, welche Prof. Soxhlet in der Münchener physiologischen Gesellschaft über die Untersuchungen Henkels machte,[1]) führte derselbe an, dass es Henkel nicht gelungen sei, Citronensäure in der Frauenmilch nachzuweisen, und dass, nach dem damaligen Standpunkte der Frage, nach welchem die Citronensäure nur als Bestandteil der Kuh- resp. Pflanzenfressermilch zu betrachten war, man sich über den Ursprung des genannten Milchbestandteiles zwei Vorstellungen machen könne:

A. Die Citronensäure ist in dem vegetabilischen Futter, Heu, Rüben etc. enthalten, und gelangt aus diesem in die Milch;

B. Dieselbe ist ein Zerfallsprodukt der Cellulose und kann bei der Gärung der letzteren im Magen und Darm der Pflanzenfresser neben anderen organischen Säuren und gasförmigen Zersetzungsprodukten möglicherweise entstehen.

Nach beiden Anschauungen würde demnach die Citronensäure der Milch, sei es direkt oder indirekt, auf den Citronensäuregehalt der Nahrung zurückzuführen sein. Hiergegen sprechen aber die von verschiedenen Seiten gemachten Beobachtungen, nach welchen die mit der Nahrung aufgenommene Citronensäure im Körper rasch verbrennt und als kohlensaures Natron oder Kali ausgeschieden wird.

---

[1]) Münchener mediz. Wochenschrift 1888, No. 19.

Schon Wöhler[1]) wies nach, dass die pflanzensauren (essig-wein-citronensaure) Alkalien im Blut in kohlensaure umgewandelt werden; die freien Säuren sollen hingegen unverändert im Harn erscheinen. Buchheim[2]) konnte keinen Unterschied in dem Verhalten der freien Säuren und ihrer Alkalisalze beobachten, und fand, dass die meisten pflanzensauren Salze, darunter auch das citronensaure Natron, schon im Darme in kohlensaure umgewandelt werden. Nach Bunge[3]) scheint diese Umsetzung keine vollkommene zu sein, da er nach Einnahme von citronensaurem Alkali stets im Harne Citronensäure nachweisen konnte, während Dragendorff[4]) angiebt, dass selbst nach Zufuhr sehr grosser Dosen Citronensäure im Harn nur mehr Spuren davon aufzufinden waren. Auch Stadelmann[5]) folgert aus seinen kürzlich von ihm und seinen Schülern ausgeführten Untersuchungen, dass bei Citronensäurezufuhr nicht die geringste Menge der Säure in den Harn übergeht und dass die Citronensäure im Blute vollständig verbrannt wird.

Als ein ganz zutreffender Einwand gegen die Möglichkeit des Überganges von Citronensäure aus der Nahrnng in die Milch sind aber die genannten Feststellungen deshalb nicht zu betrachten, weil mit der Milchsekretion nicht Endprodukte des Stoffzerfalls, sondern Körpersubstanz selbst zur Ausscheidung gebracht wird. Auch die Kohlehydrate verbrennen im Körper vollständig, das milchproduzierende Tier scheidet aber ein Kohlehydrat in grosser Menge aus: den Milchzucker. Die Möglichkeit des direkten Überganges der Citronensäure aus der Nahrung in die Milch ist also auf Grund oben gemachter Angaben nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen. Die im folgenden zu beschreibenden Versuche sollen über diese Frage Aufklärung verschaffen.

Henkel, welchem es nur darauf ankam, den Nachweis zu führen, dass die Citronensäure ein normaler Milchbestandteil sei, begnügte sich mit einer präparativen Abscheidung und annähernden Feststellung der in der Kuhmilch enthaltenen Mengen.

---

[1]) Tiedemann's Zeitschr. f. Phys. I, 1824.

[2]) Buchheim, Arch. f. physiol. Heilkunde. N. F. 1.

[3]) Bunge, Zeitschr. f. Biologie IX, 1873.

[4]) Dragendorff, Ermittelung der Gifte, 1888, 541.

[5]) Stadelmann, Über den Einfluss der Alkalien auf den menschlichen Stoffwechsel. Stuttgart bei Enke. 1890.

Für das weitere Studium dieses Milchbestandteiles und speziell das Studium der Beziehungen zwischen Nahrung und Gehalt der Milch an Citronensäure ist aber zunächst notwendig, eine Methode zu besitzen, welche eine genaue quantitative Bestimmung dieses Milchbestandteiles gestattet.

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die Abscheidung der Citronensäure aus wässriger Lösung in Form von Baryt-, Kalk-, Blei- oder anderen Metallsalzen keine vollständige ist, da diese Niederschläge in Wasser, auch wenn sie durch anhaltendes Kochen krystallinisch geworden sind, keineswegs unlöslich sind, resp. dass auch andere Bestandteile des Milchserums ähnliche schwer lösliche Verbindungen liefern, bewährte sich schliesslich als ein vollkommen geeignetes Fällungsmittel, Ammoniak angewendet auf eine alkoholische Lösung der Citronensäure, welchen Weg auch Barfoed[1]) einschlug, um Apfelsäure, deren Ammonsalz in Alkohol leichter löslich ist, von Citronensäure, für den qualitativen Nachweis beider Säuren, zu trennen.

Setzt man zu einer siedend heissen Lösung von Citronensäure in absolutem Alkohol alkoholisches Ammoniak (100 ccm konzentriertes Ammoniak mit absolutem Alkohol auf 1 Liter aufgefüllt), so erhält man eine milchige Fällung von citronensaurem Ammon, welche sich nach längerem Stehen zu einem krystallinischen Absatz ausbildet. In dem klaren Filtrate sind kaum mehr Spuren von Citronensäure enthalten. Die Fällung ist eine quantitative. Aber auch die Phosphor- und Schwefelsäure wird unter diesen Umständen ausgefällt, sodass das Fällungsprodukt bei Anwesenheit dieser Säuren, z. B. bei der Untersuchung des Milchserums, ein Gemenge von citronen-, schwefel- und phosphorsaurem Ammon darstellt. Die Citronensäure lässt sich aber in einem solchen Gemenge zweckmässig durch eine der bekannten Oxydationsmethoden bestimmen. Die Titration mit Kaliumpermanganat, sowie die Oxydation mit Kaliumbichromat und konzentrierter Schwefelsäure, Auffangen und Wägen der gebildeten Kohlensäure nach den Angaben von Messinger[2]) gaben keine zuverlässigen Resultate, wohl aber die letztere Oxydationsmethode bei Anwendung verdünnterer Lösungen und Titrieren der unverbrauchten Chromatmenge,

[1]) Barfoed, Lehrbuch der organ. qualit. Analyse 1881, pag. 46.
[2]) Messinger, Ber. d. d. chem. Ges. 1888, 2910.

etwa in der Weise, wie HEHNER[1]) bei der Bestimmung von Glycerin verfährt.

Zu den nun mitzuteilenden Versuchen wurde käufliche, reinste Citronensäure verwendet, deren Wassergehalt — bestimmt durch Trocknen im Vacuum-Trockenschrank bei 100° C. — 8.49 % betrug.

Die Oxydation der Citronensäure durch Kaliumbichromat und Schwefelsäure geht sehr glatt vor sich, wenn man zu 20 ccm der Citronensäurelösung, bis 1.250 g in 100 ccm enthaltend, einen Überschuss von titrierter Bichromatlösung (20—30 ccm) zufügt und nun 20—25 ccm konzentrierter Schwefelsäure unter Umschütteln einfliessen lässt. Die Kohlensäureentwicklung beginnt sofort und ist nach etwa $^1/_4$stündigem Erhitzen, wobei jedoch die Flüssigkeit nicht zum Kochen kommen darf, beendet. Die Reaktion verläuft in der Weise, dass die Citronensäure geradeauf zu Kohlensäure und Wasser verbrannt wird, nach der Gleichung:

$$C_6H_8O_7 + 6\,CrO_3 = 6\,CO_2 + 3\,Cr_2O_3 + 4\,H_2O.$$

Bei der angegebenen Konzentration wird die Chromsäure noch nicht durch Schwefelsäure unter Sauerstoffausscheidung zersetzt. Das Vorhandensein des notwendigen Chromatüberschusses ergiebt sich dadurch zu erkennen, dass die Farbe der Lösung nach Beendigung der Oxydation keine rein grüne ist, sondern einen deutlich braunen Ton hat. Man verdünnt nun mit ca. 50 ccm Wasser, setzt eine titrierte Lösung von schwefelsaurem Eisenoxydulammon im Überschuss zu, bis der grünlich braune Ton in reines Grün umschlägt, und titriert mit Bichromatlösung zurück.[2]) Die Endreaktion mit Ferricyankalium tritt immer sehr scharf ein und wird durch die Farbe des Chromoxydes nicht gestört. Nach obiger Gleichung berechnet sich, dass 885 g Kaliumdichromat 192 g Citronensäure oxydieren, oder 4.61 g Bichromat 1 g Citronensäure.

Verwendet wurden: Chromatlösung: 46.1 g Kaliumdichromat im Liter; Eisenlösung: ca. 150 g schwefelsaures Eisenoxydul-Ammon gelöst in 700 ccm Wasser, versetzt mit 100 ccm konzentrierter Schwefelsäure, aufgefällt zu 1 Liter. 20 ccm der Eisenlösung, mit ca. 80 ccm Wasser verdünnt, verbrauchten 7.7—8.0 ccm der Chromatlösung.

---

[1]) HEHNER, Zeitschr. f. anal. Chemie 27, 518.

[2]) Vgl. MOHR, Lehrb. d. Titrationsmethode. 6 Aufl., 265 u. f.

20 ccm Citronensäurelösung, enthaltend 0.137 g Citronensäure, wurden mit 25 ccm obiger Bichromatlösung und 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure oxydiert, hierauf mit 50 ccm Wasser verdünnt, mit 40 ccm Eisenlösung versetzt und mit Chromsäure titriert. Nach Abzug der den 40 ccm Eisenlösung entsprechenden 15.2 ccm Bichromatlösung trafen auf Chromsäurelösung zur Oxydation von 134 mg Citronensäure

1. 13.5; 2. 13.4; 3. 13.4; 4. 13.5; 5. 13.4; 6. 13.5; 7. 13.4; 8. 13.4;

also durchschnittlich 13.4 ccm.

Es berechnete sich daraus der Titer der Bichromatlösung für 1 ccm 0.0102 g Citronensäure.

Theoretisch mussten bei ganz reinem Bichromat auf 137 mg Citronensäure 13.7 ccm Chromsäurelösung verbraucht werden. Unter Zugrundelegung obigen Wirkungswertes wurde nun der Citronensäuregehalt verschiedener wässriger Lösungen unter Anwendung von je 20 ccm Lösung ermittelt.

**Tabelle I.**

| No. | mg Citronens. angewendet | ccm Chromatlösung | mg Citronens. gefunden | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 228.3 | 22.4 | 228.5 | |
| 2 | 183.0 | 17.9 | 182.6 | |
| 3 | 68.5 | 6.8 | 69.0 | |
| 4 | 34.3 | 3.3 | 33.7 | |
| 5 | 137.0 | 13.4 | 137.0 | Zusatz von schwefelsaurem und phosphorsaurem Ammon. |
| 6 | 137.0 | 13.35 | 136.0 | |
| 7 | 137.0 | 13.3 | 136.0 | Zusatz von 50 mg Chlorammon. |
| 8 | 137.0 | 13.7 | 140.0 | |
| 9 | 137.0 | 13.5 | 138.0 | Zusatz von 100 mg Chlorammon. |
| 10 | 137.0 | 13.7 | 140.0 | |

Aus diesen Zahlen ergiebt sich, dass sowohl bei Anwendung von grösseren als auch geringeren Mengen Citronensäure richtige Werte erhalten werden; dass die Anwesenheit von schwefel- und phosphorsauren Salzen ohne Einfluss auf das Resultat ist; dass man aber bei Gegenwart von Chloriden infolge der eintretenden Chlorentwicklung etwas zu hohe Zahlen erhält. Die Differenzen bei den angewandten verhältnismässig sehr grossen Mengen Chlorammon (50 und 100 mg, Versuch

7—10) sind jedoch gering und für die Bestimmung der Citronensäure in Milch bedeutungslos, da man es in diesem Falle immer mit sehr geringen Chloridmengen zu thun hat, und überdies auch vollständig chlorfreie Lösungen leicht zu erzielen sind.

Die vollständige Fällbarkeit der Citronensäure als in Alkohol fast unlösliches Ammoniumcitrat und die näheren Bedingungen, welche bei der Abscheidung eingehalten werden müssen, zeigt folgende Versuchsreihe. In diesen Versuchen wurde die Fällung der alkoholischen Lösung mit je 10 ccm des ammoniakalischen Alkohols (100 ccm konzentriertes Ammon mit absolutem Alkohol aufgefällt zu 1 Liter) bewirkt, der krystallinisch gewordene Niederschlag von der vollständig klar gewordenen Flüssigkeit abfiltriert, mit absolutem Alkohol ausgewaschen, in Wasser gelöst und die Lösung nach Zusatz von etwas Ammoniak unter lebhaftem Kochen auf ca. 20 ccm konzentriert. In der erkalteten, nun alkoholfreien Lösung wurde die Citronensäure in der angegebenen Weise mittelst Kaliumbichromat bestimmt.

## Tabelle II.

Titer der Bichromatlösung: 1 ccm = 10.2 mg Citronensäure.

| No. | mg Citrons. angewendet | ccm Chroms.-lösung | mg. Citrons. gefunden | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 137 | 13.5 | 138 | gelöst in 25 ccm absolutem Alkohol |
| 2 | 137 | 13.4 | 137 | |
| 3 | 137 | 13.4 | 137 | „ „ 50 „ „ „ |
| 4 | 137 | 13.2 | 135 | „ „ 75 „ „ „ |
| 5 | 137 | — | — | „ „ 100 „ „ „ |
| 6 | 137 | 13.5 | 138 | „ „ 50 „ 98% igem „ |
| 7 | 137 | 13.3 | 136 | |
| 8 | 137 | 13.2 | 135 | „ „ 50 „ 96% igem „ |
| 9 | 137 | 13.3 | 136 | |
| 10 | 137 | 13.3 | 136 | „ „ 50 „ 94% igem „ |
| 11 | 137 | 12.9 | 132 | „ „ 25 „ 92% igem „ |
| 12 | 137 | 12.8 | 131 | „ „ 50 „ 92% igem „ |
| 13 | 183 | 15.8 | 161 | gekocht am Rückflusskühler. |
| 14 | 183 | 14.8 | 151 | |
| 15 | 183 | 17.7 | 181 | |
| 16 | 183 | 17.9 | 183 | gekocht am Rückflusskühler nach Zusatz von kohlensaurem Ammon. |
| 17 | 183 | 17.8 | 182 | |
| 18 | 183 | 17.7 | 181 | |

Aus diesen Versuchen geht zunächst die Schwerlöslichkeit des Tri-Ammoncitrates in absolutem Alkohol hervor, da die angewandte Menge Citronensäure aus 25 und ebenso 50 ccm absolutem Alkohol vollständig wieder erhalten wurde. (Versuch 1, 2, 3); auch aus 75 ccm Alkohol wurde fast die ganze Menge Citronensäure wieder erhalten (Versuch 4); bei der Ausfällung aus 100 ccm Alkohol blieb die Flüssigkeit auch nach 24stündigem Stehen trübe und nicht filtrierbar. Es ergiebt sich ferner, dass man in der Verdünnung des Alkohols mit Wasser bis zu der Grenze von etwa 95%igen Alkohol gehen kann. In den Versuchen mit Anwendung von 98, 96 und 94%igem Alkohol wurde die ganze Menge der angewandten Citronensäure wieder erhalten. Bei Anwendung von 92%igem Alkohol traten schon nennenswerte Verluste ein.

Die Klärung der milchigen Flüssigkeit nach dem Ausfällen mit Ammon bietet manchmal Schwierigkeiten; es ist dies namentlich der Fall bei der zweiten Ausfällung der Milch-Citronensäure. Um die krystallinische Abscheidung des Ammoncitrates zu beschleunigen, ist es zweckmässig, die Flüssigkeit $^1/_4$ Stunde lang am Rückflusskühler im Wasserbade zu erhitzen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass durch längeres Erhitzen auch bei bester Rückflusskühlung Ammoniak entweicht, dass damit eine Dissociation des Triammoniumcitrates eintritt und sich in Alkohol lösliche saure Ammonsalze bilden, wodurch Verluste entstehen, wie die Versuche 13 und 14 zeigen. (Verlust 22 und 32 mg Citronensäure). Ein Zusatz von 2—3 g kohlensauren Ammons verhindert diesen Übelstand und gestattet die Erhaltung dauernder Alkalescenz, ohne dass, wie bei Anwendung von Ammoniakflüssigkeit, der Wassergehalt des Alkohols vermehrt wird. Nach mehrstündigem Stehen, unter häufigem Umschütteln, klärt sich die Flüssigkeit und der gebildete krystallinische Absatz lässt die ganze angewendete Menge Citronensäure wieder finden (Versuch 15, 16, 17, 18).

Die Bestimmung der Citronensäure in Milch erfolgt nun in der Weise, dass zunächst eine Trennung der Citronensäure von der Hauptmasse der anderweitigen Serumbestandteile mittelst Äther-Alkohol vorgenommen wird. In reinem Alkohol löst sich die Citronensäure leicht; auch in reinem Äther ist dieselbe ziemlich löslich, und zwar lösen nach einem von mir angestellten Versuche 100 ccm reinen Äthers 1.5 g käufliche wasserhaltige

Citronensäure, und eine 5 %ige alkoholische Lösung von Citronensäure bleibt auch auf Zusatz des 5fachen Volumens Äther klar.

Zur Gewinnung eines eiweiss- und fettfreien Milchserums, in welchem die Citronensäure sicher gelöst ist, versetzt man 400 ccm Milch mit 4 ccm $2^1/_2$ Normal-Schwefelsäure, kocht auf, setzt ca. 10 g spanische Klär-Erde zu, die zuvor mit Wasser zu einem dicken Schleim angerieben wurde, kocht nochmals auf, spült nach dem Erkalten in einen $^1/_2$ Liter-Kolben und füllt auf die Marke auf. Das Filtrat ist in den meisten Fällen vollkommen klar; zeigt die Flüssigkeit noch eine schwache Trübung, so filtriert man noch einmal mit spanischer Erde, die im trockenen Zustande zuvor mit der Flüssigkeit selbst angerieben wird. Zu 100 ccm Filtrat, entsprechend 80 ccm Milch, wird soviel Barytwasser hinzugefügt, als der zugesetzten Schwefelsäure (0.8 ccm $2^1/_2$ Normal-Schwefelsäure auf 80 ccm Milch) entspricht, wodurch die Milch wieder auf ihre ursprüngliche Acidität gebracht wird. Diese Vorsichtsmassregel — Eindampfen nach bewirkter Neutralisation — ist in der leichten Zersetzbarkeit der Citronensäure durch konzentrierte Mineralsäuren in der Hitze begründet. Man dampft nun in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz ein; gegen Ende des Abdampfens muss zur Erzielung eines ganz homogenen Sirups fleissig umgerührt werden. Bevor der Sirup noch vollständig erkaltet und der Milchzucker erstarrt ist, setzt man demselben 3.2 ccm der $2^1/_2$ Normal-Schwefelsäure unter Umrühren zu. Diese Menge genügt, um alle Citronensäure in Freiheit zu setzen, wie durch folgenden Versuch gefunden wurde. 100 ccm Milch mit $^1/_2$ Normal-Schwefelsäure titriert, unter Anwendung von Methylorange als Indikator, verbrauchten bis zum Umschlag der gelben Farbe in Rot, also bis zum Auftreten freier Mineralsäure 18 ccm $^1/_2$ Normal-Schwefelsäure, sodass also ein Zusatz von 20 ccm $^1/_2$ Normal-Schwefelsäure zu 100 ccm Milch, oder von 3.2 ccm $2^1/_2$ Normal-Schwefelsäure zu 80 ccm Milch unter allen Umständen genügt, um alle Citronensäure als freie Säure zu erhalten. Zu dem so erhaltenen angesäuerten Sirup setzt man nach und nach unter Umrühren 20 ccm absoluten Alkohol und nach kurzem Absitzenlassen 60 ccm Äther zu. Die Filtration und das Auswaschen des Rückstandes mit Äther-Alkohol (20 ccm absoluten Alkohol, 60 ccm Äther) erfolgt am zweckmässigsten in der Weise, dass man einen kleinen, mit Baumwolle gefüllten

Trichter mit der Basis nach unten in die Porzellanschale einstellt und die Flüssigkeit mit der Wasserluftpumpe in bekannter Weise absaugt. Der Milchzucker fällt nach dem angegebenen Verfahren immer krystallinisch aus, und erhält man einen leicht auswaschbaren Krystallbrei. Das klare Filtrat wird in einen Destillierkolben gespült, mit soviel alkoholischem Ammoniak versetzt, dass eine bleibende Trübung auftritt, also neutralisiert, und der Äther bis auf einen Flüssigkeitsrückstand von etwa 20 ccm abdestilliert, letzteres deshalb, weil ein grösserer Äthergehalt auf die krystallinische Abscheidung des citronensauren Ammons einen ungünstigen Einfluss ausübt. Zum Destillationsrückstande — ca. 20 ccm — werden 60 ccm absoluten Alkohols hinzugefügt, die Lösung im Wasserbade zum Kochen erhitzt, und nun die Citronensäure durch 10 ccm alkoholischen Ammoniaks vollständig ausgefällt. Nach mehrstündigem Stehen erhält man eine völlig klare Lösung und einen krystallinischen Absatz, von welchem sich die überstehende klare Flüssigkeit in der Regel direkt abgiessen lässt. Der Niederschlag ist frei von Milchzucker, enthält aber neben citronensaurem noch schwefel- und phosphorsaures Ammon, nebst sehr geringen Mengen von Chlorammon; ausserdem noch eine geringe Menge einer organischen Substanz, deren Natur ich nicht feststellen konnte. Die Anwesenheit letzterer Verunreinigung in der gefällten Substanz ergiebt sich daraus, dass bei doppelter Fällung stets eine etwas niedrigere Zahl für den Verbrauch an ccm Chromsäurelösung gefunden wird, als bei einmaliger Fällung, eine Differenz, die bei der Schwerlöslichkeit des Ammoncitrates nicht auf Verluste an Citronensäure zurückgeführt werden kann. Eine dritte Fällung giebt hingegen das gleiche Resultat, wie die zweite Fällung, woraus hervorgeht, dass durch einmalige Wiederholung der Fällung ein Niederschlag erhalten wird, der keine andere organische Substanz als Citronensäure enthält, und dass eine dritte Fällung zur Erzielung dieses Effektes überflüssig ist.

Zur Ausführung der zweiten Fällung verfährt man in der folgenden Weise: Man giesst die über dem ersten Niederschlage stehende alkoholische, etwas gelblich gefärbte Flüssigkeit ab, filtriert eventuell suspendierte Teilchen ab, wobei man möglichst vermeidet, vom Absatze etwas auf das Filter zu bringen. Zu dem im Kolben befindlichen Niederschlage setzt man 1 ccm $2^1/_2$ Normal-Schwefelsäure und 1 ccm Wasser, um die Citronensäure

wieder alkohollöslich zu machen, fügt 60 ccm absoluten Alkohol zu und fällt mit 10 ccm alkoholischen Ammoniaks. Die Flüssigkeit klärt sich bei dieser zweiten Fällung sehr schwer; sie war oft nach 24 Stunden noch trübe, weshalb man zweckmässig die Flüssigkeit unmittelbar nach der Fällung, unter Zusatz von kohlensaurem Ammon, wie früher angegeben, am Rückflusskühler erhitzt.

Zur Filtration der nach mehrstündigem Stehen klar gewordenen Flüssigkeit bedient man sich eventuell desselben Filters, auf welchem man suspendierte Teilchen der ersten Fällung abfiltriert hat, nachdem dasselbe mit absolutem Alkohol ausgewaschen wurde. Die Lösung des Niederschlages mit Wasser, das Konzentrieren der Lösung auf ca. 20 ccm, die Zersetzung des Ammoniumcitrats mit Bichromat erfolgt schliesslich genau nach den früher gemachten Angaben.

**Tabelle III.**

Titer der Bichromatlösung: 1 ccm = 10.2 mg Citronensäure.

| No. | ccm Chroms.-lösung | mg Citronens. in 100 ccm Milch | | No. | ccm Chroms.-lösung | mg Citronens. in 100 ccm Milch | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 13.6 | 173 | | 3 | 14.6 | 186 | 1. Fällung |
| | 13.7 | 174 | 1. Fällung | | 13.3 | 170 | 2. „ |
| | 13.3 | 170 | | | 13.6 | 173 | |
| | 12.3 | 157 | | | 13.3 | 170 | 3. „ |
| | 12.5 | 158 | 2. „ | | 13.4 | 171 | |
| 2 | 14.7 | 187 | | 4 | 14.7 | 187 | |
| | 14.5 | 185 | 1. „ | | 16.6 | 212 | 1. „ |
| | 14.4 | 184 | | | 14.4 | 184 | |
| | 13.2 | 168 | | | 14.5 | 185 | 2. „ |
| | 13.3 | 170 | | 5 | 16.9 | 215 | 1. „ |
| | 13.5 | 172 | 2. „ | | 15.4 | 196 | 2. „ |
| | 13.4 | 171 | | | 15.4 | 196 | 3. „ |

Über einige Resultate, welche mit dieser Methode bei Kuhmilch gefunden wurden, giebt Tahelle III Aufschluss.

Hiernach berechnet sich der Citronensäuregehalt der Kuhmilch höher, als Henkel durch präparative Abscheidung (1—1.4 g pro Liter) gefunden, nämlich zu etwa 1.7—2 g pro Liter, welche Menge sich dem von Söldner[1]) aus dem Verhältnis von Basen

[1]) Söldner: Die Salze der Milch. Landw. Vers.-Stat. XXXV, S. 374.

zu Säuren im Milchserum berechneten Quantum von 2.5 g mehr nähert.

Die beschriebene Methode eignet sich auch für die Bestimmung der Citronensäure in gesäuerter Milch, da Milchsäure ein in Alkohol leicht lösliches Ammonsalz bildet, resp. unter den hier eingehaltenen Verhältnissen, wie ich mich überzeugt habe, keine Fällung giebt.

Von Wichtigkeit für den vorliegenden Gegenstand und von speziellem Nutzen für die Beantwortung der Frage, ob die Citronensäure der Milch direkt oder indirekt — Zerfallsprodukt der Cellulose bei der Vergärung im Verdauungsapparat — aus der Nahrung stammt, d. h. auf einen Übergang von resorbierter Citronensäure in die Milch zurückzuführen ist, ist das Vorkommen oder Fehlen der Citronensäure in der Frauenmilch. Einleitend wurde erwähnt, dass es Henkel nicht geglückt sei, in der Frauenmilch Citronensäure zu finden. Es schien mir aber doch fraglich, ob mit der von mir ausgebildeten Untersuchungsmethode nicht doch der Nachweis zu erbringen sei, dass die Frauenmilch Citronensäure enthält. Zu diesem Zwecke prüfte ich zunächst eine Probe Frauenmilch qualitativ auf Citronensäure mittelst der Reaktion von Sabanin-Laskowski in Kombination mit meinem Verfahren der Abscheidung der Citronensäure als in Alkohol unlösliches Ammoniumcitrat. Der Nachweis der Citronensäure in Milch mit Zuhülfenahme der genannten Reaktion begegnet mancherlei Schwierigkeiten. Grössere Mengen von phosphor- und schwefelsauren Salzen verzögern die Reaktion etwas, jedoch tritt auch bei Gegenwart dieser Salze immer die intensive charakteristische Farbenreaktion ein. Dagegen scheinen verschiedene organische Substanzen auch in sehr geringen Mengen die Reaktion zu verhindern; dieselbe tritt z. B. nicht ein bei Gegenwart von Milchzucker; schon 1 mg Milchzucker verhindert die Reaktion, welche mit der aus 100 ccm Milch abgeschiedenen Citronensäure ausgeführt wird, fast völlig. In der Frauenmilch gestalten sich die Verhältnisse für den Nachweis der Citronensäure wegen des grösseren Milchzuckergehaltes noch weit ungünstiger.

Bei der Prüfung der Verhältnisse, unter welchen die Reaktion am sichersten eintritt, habe ich übrigens gefunden, dass die von Sabanin-Laskowski[1]) für diese Reaktion angegebene

[1]) Fresenius, Zeitschr. f. analyt. Chemie, XVII, 74.

Erhitzungstemperatur von 110—120° nicht die günstigste ist. Die Genannten behandeln die Citronensäure im zugeschmolzenen Rohr mit Ammon bei 110—120° im Lufttrockenschranke, auf dessen ungleichartige Temperaturverhältnisse wohl die von mir gefundene Differenz zurückzuführen ist. In den nachstehenden Versuchen wurde die Citronensäure im zugeschmolzenen Rohre immer in einem Dampftopfe 6 Stunden unter Druck behandelt. Bei Anwendung eines Überdruckes von 1 Atmosphäre (ca. 120°) wurde in der Regel keine oder nur eine sehr schwache Reaktion erhalten, während dieselbe bei einem Drucke von 2 Atm., entsprechend etwa 134°, auch bei den Minimalmengen immer sehr deutlich eintrat.

Der qualitative Nachweis der in der Kuhmilch enthaltenen Citronensäure, ausgeführt mit dem Ammoniumcitrat der erstmaligen Fällung, gab immer nur eine sehr undeutliche Reaktion, was zweifelsohne durch geringe Mengen der früher erwähnten organischen Substanz verursacht wird, da Milchzucker in dem Niederschlage nicht enthalten ist. Es wurde deshalb, wie bei der quantitativen Bestimmung, doppelt gefällt, nur mit der folgenden kleinen Abänderung. Nach dem Abgiessen des überstehenden Alkohols wurden pro 100 ccm Milchfiltrat 1 ccm $2^1/_2$ Normal-Schwefelsäure und 1 ccm Wasser und dann je 60—70 ccm absoluten Alkohols zugesetzt. Diese Menge Schwefelsäure genügt nicht, um alle Phosphorsäure in Freiheit zu setzen, wohl aber wird alle Citronensäure frei oder in saures, alkohollösliches Citrat umgewandelt, sodass bei Zusatz des Alkohols das in den geringen Mengen Schwefelsäure gelöste phosphor- und schwefelsaure Ammon wieder ausfällt, während die Citronensäure und ein Teil der Phosphorsäure in Lösung bleiben. Setzt man nun zu dem klaren Filtrate alkoholisches Ammon und kocht mit kohlensaurem Ammon am Rückflusskühler im Wasserbade, so setzen sich aus der milchigen Flüssigkeit die Ammonsalze bald klar ab. Nach dem Filtrieren löst man mit Wasser, dampft die Lösung auf dem Wasserbade bis auf etwa 1 ccm ein und spült den Rückstand mit ca 3 ccm. konzentrierten Ammoniaks in das zuzuschmelzende Glasrohr zur Prüfung nach Sabanin-Laskowski. Es gelang auf diese Weise der Nachweis von Citronensäure ebenso bei Anwendung von 80 als von 160 ccm Milch (100 resp. 200 ccm Filtrat). Die Reaktion trat manchmal erst nach 24 Stunden ein, zeigte aber immer ein

intensives Blau, und namentlich trat nach etwa 48 Stunden der charakteristische Übergang in intensives Grün sehr schön ein.

Auf ähnliche Weise gelang auch der Nachweis der Citronensäure in Frauenmilch. 400 ccm Frauenmilch wurden mit 4 ccm $2^1/_2$ Normal-Schwefelsäure und spanischer Erde, wie bei der Kuhmilch angegeben, behandelt; von der auf 500 ccm aufgefüllten Flüssigkeit wurden 400 ccm Filtrat eingedampft und nach Zusatz von 6 ccm $2^1/_2$ Normal-Schwefelsäure (man bedarf bei der Frauenmilch weniger Mineralsäure, um alle Citronensäure in Freiheit zu setzen) der Milchzucker mit 60 ccm Alkohol und 180 ccm Äther ausgefällt. Der bei der ersten Fällung mit alkoholischem Ammoniak erhaltene Niederschlag wurde mit 2 ccm $2^1/_2$ Normal-Schwefelsäure gelöst, nochmals gefällt, der erhaltene Niederschlag in Wasser gelöst. Die Lösung wurde bis auf ca. 1 ccm eingedampft und, wie früher bei der Prüfung der Kuhmilch angegeben, verfahren. Die charakteristische Reaktion trat auch hier sehr scharf ein.

In gleicher Weise wurde die quantitative Bestimmung der Citronensäure in Frauenmilch, und zwar in 200 ccm des Filtrates, ausgeführt, d. h. unter Anwendung der für den qualitativen Nachweis angegebenen Zusätze von Schwefelsäure und Äther-Alkohol. Die Citronensäurebestimmung mit Kaliumbichromat ergab in der ersten Ausfällung 0.57 g Citronensäure pro Liter Milch, in der zweiten Fällung 0.54 g Citronensäure, also etwa den dritten Teil der in der Kuhmilch enthaltenen Citronensäure.

Hiermit ist also erwiesen, dass auch die Frauenmilch Citronensäure enthält, und dass derselben nicht jene Ausnahmestellung zukommt, welche sie nach dem negativen Befunde Henkels hinsichtlich dieses Milchbestandteiles einzunehmen schien.

In den nun im folgenden zu beschreibenden, mit Ziegen ausgeführten Fütterungsversuchen wurde in solchen Fällen, in welchen die Menge der Trockensubstanz von der durchschnittlichen Trockensubstanzmenge der Kuhmilch nur eine verhältnismässig geringe Abweichung zeigte, die Citronensäurebestimmung in der beschriebenen Weise ausgeführt. Da oft nur wenig Material zur Untersuchung vorlag, wurde in solchen Fällen die ganze vorhandene Milchmenge verwendet, ebenso das ganze Filtrat, und alle Zusätze von Schwefelsäure, Barytwasser,

Alkohol etc. entsprechend abgeändert. Überschritt die Trockensubstanzmenge den normalen Gehalt wesentlich, so wurde die Milch durch Wasserzusatz auf den normalen Trockensubstanzgehalt gebracht und dann wie oben verfahren.

Da die Trockensubstanzmenge sehr stark wechselte, so wurde der Vergleichbarkeit der Resultate wegen die gefundene Citronensäuremenge auch in Prozenten der Trockensubstanz angeführt.

1. Fütterung 7 Tage Wiesenheu; Milch vom 5., 6. und 7 Tage:

| Trockensubstanzgehalt der Milch % | g Citronensäure im Liter | % Citronensäure in der Trockens. | Produzierte Milchmenge. |
|---|---|---|---|
| 13.8 | 1.44 | 1.04 | 880 |
| 14.2 | 1.47 | 1.03 | 800 |
| 13.6 | 1.01 | 0.74 | 850 |

2. Fütterung mit Biertrebern; an die Heufütterung anschliessend, wurde versucht, Biertreber als alleiniges Futter zu verfüttern, als einem Material, welches nur eine minimale Menge in Wasser löslicher Substanzen enthält und auch seiner Abstammung nach als frei von Citronensäure und organischen Säuren überhaupt betrachtet werden muss. Es wurde versucht, trockene Treber, wie sie seit einiger Zeit als Handelsfuttermittel vorkommen, oder solche im aufgebrühten Zustande zu verfüttern. Die Ziege frass jedoch innerhalb 3 Tagen fast nichts von diesem Futter, die Milchproduktion verringerte sich sofort bedeutend und sank am dritten Tage auf 200 g, welche enthielten:

23.62 1.63 0.69 200.

Das geringe Quantum der ermolkenen Milch und deren abnorm hoher Trockensubstanzgehalt deuten darauf hin, dass man es hier im wesentlichen mit einer Hungermilch zu thun hatte.

3. Fütterung mit Rüben und Wiesenheu nach vorhergehender Fütterung mit Wiesenheu allein; Milch am 3. Tage:

13.96 0.77 0.55 650.

4. Fütterung mit Rüben, Haferstroh und Leinkuchen; die Milch enthielt am 5. und 6. Fütterungstage:

13.4 1.31 0.98 750
13.62 1.11 0.82 700.

5. Fütterung mit Kleeheu 6 Tage, Milch am 5. und 6. Tage:

13.46 1.12 0.83 550
14.62 1.06 0.73 500.

6. Fütterung mit Schwarzbrot; die Ziege frass nur am ersten Tage eine reichliche Menge, lieferte dementsprechend eine grössere Milchmenge, als an den vorhergehenden Tagen bei Kleeheufütterung; dann wurde die Fresslust immer geringer, und am 4. Tage verweigerte die Ziege die Nahrungsaufnahme gänzlich. Die Milch vom 2., 3. und 4. Tage enthielt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 12.64 | 1.44 | 1.13 | 700 |
| 12.50 | 1.20 | 0.96 | 600 |
| 18.76 | 1.02 | 0.54 | 170. |

7. Nach dreitägiger Erholung bei Heufütterung und Einschaltung eines Hungertages zur Erhöhung der Fresslust wurde abwechselnd Schwarzbrot, Weissbrot und Weizenmehl, letzteres verrührt in Wasser, verabreicht, und zwar in der Absicht, durch einen Wechsel in der Nahrung die Nahrungsaufnahme zu befördern, und mit diesem Futter eine sowohl Citronensäurefreie als möglichst Rohfaser- resp. Cellulose-arme Nahrung zu verfüttern (Brot und Weizenmehl enthalten höchstens 2% Rohfaser). Es gelang nur 7 Tage lang diese Nahrung dem Tiere beizubringen, d. h. am 5. und 6. Tage nahm die Ziege nur ein Minimum an Nahrung zu sich, und am 8. verweigerte sie vollständig die Nahrungsaufnahme. Die an den letzten Versuchstagen untersuchte Milch enthielt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 19.92 | 1.61 | 0.81 | 275 |
| 20.76 | 2.98 | 1.43 | 300 |
| 18.62 | 1.95 | 1.04 | 140 |
| 26.00 | 2.71 | 1.04 | 45 |
| 23.64 | 2.20 | 0.93 | 160 |
| 16.22 | 0.82 | 0.51 | 185 |

Geringes Milchquantum und abnorm hoher Trockensubstanzgehalt charakterisieren die untersuchten Milchproben ebenfalls als Hungermilch.

8. Fütterung mit Wiesenheu und steigenden Gaben Citronensäure. Die Citronensäure wurde in Form einer mit Natronlauge teilweise neutralisierten Lösung einem Teil des Tränkewassers — 1 Liter — zugesetzt und weitere Mengen Tränkewasser erst gegeben, wenn die Citronensäurelösung aufgenommen war. Die schwach säuerlich schmeckende Lösung wurde von der Ziege sehr gerne getrunken, und auch grössere Mengen als 40 g pro Tag würden ohne Anstand aufgenommen worden sein.

Das Versuchstier war nach einer vierwöchentlichen Erholung bei Heu und Grasweide auf sein anfängliches Milchproduktionsvermögen wieder zurückgekehrt.

| g Citronens. pro Tag | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 10 | 13.6 | 0.95 | 0.70 | |
| 15 | 12.2 | 1.09 | 0.87 | |
| 15 | 11.86 | 0 95 | 0.80 | |
| 20 | 12.22 | 0.88 | 0.72 | 600 |
| 25 | 12.52 | 1.19 | 0.95 | bis |
| 30 | 12.76 | 0.95 | 0.74 | 700 |
| 30 | 12.86 | 1.34 | 1.11 | |
| 40 | 13.04 | 1.30 | 0.99 | |
| 40 | 12.70 | 1.02 | 0.80 | |

9. Fütterung mit Erbsensuppe, bei künstlicher Ernährung mittelst der Schlundsonde. Nachdem es sich als unmöglich erwiesen hatte, eine Ziege mit Brot oder Weizenmehltrank längere Zeit zu ernähren, weil die Aufnahme der Nahrung nach wenigen Tagen ganz verweigert wird, so wurde versucht, eine dem Versuchszwecke, nicht dem Belieben des Tieres, entsprechende flüssige Nahrung der Ziege mittelst der Schlundsonde beizubringen. Einer zweiten Ziege von grösserer Milchergiebigkeit wurden pro Tag 500 g Erbsenmehl, aufgerührt in 2 Liter Wasser, in 2 Portionen direkt in den Pansen eingegossen. Am 5. Tage jedoch erkrankte das Tier und am 7. verendete dasselbe. Herr Prof. Feser von der tierärztlichen Hochschule hatte die Güte, die Sektion vorzunehmen, welche weder eine Verletzung noch eine Erkrankung irgend eines Organes ergab und eine nachweisbare Todesursache nicht konstatieren liess. Jedoch zeigte sich folgendes auffallende Resultat: Im Pansen fanden sich 7.2 kg und im Labmagen 0.8 kg allem Anscheine nach ganz unveränderte Erbsensuppe, also fast die ganze Menge der zugeführten Nahrung (10 kg). Von Resten der vorhergegangenen Heufütterung war weder in einem der Magen, noch im Darm etwas zu finden; der Mastdarm war leer. Am 2. Fütterungstage war der Kot breiig, graugrün, am 3. Tage grau, ohne jede Grünfärbung; da dem Versuch ein Hungertag voraus ging, so war also am 4. Tage nach der Heufütterung der Verdauungsapparat frei von allen Resten des vorhergegangenen Futters, Am letzten Heufütterungstage hatte die Ziege 2300 und am Hungertage noch 1300 g Milch produziert. Die Milch am Hungertage enthielt:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 13.7 | 1.55 | 1.13 | 1300 |

Die Milch an den 4 Tagen mit Erbsensuppe

| | | | |
|---|---|---|---|
| 13.28 | 1.11 | 0.83 | 950 |
| 12.14 | 1.78 | 1.46 | 600 |
| 13.10 | 0.95 | 0.73 | 380 |
| 14.16 | 0.89 | 0.63 | 320 |

Obwohl diese Milch unter sehr beschränkter Nahrungszufuhr produziert wurde, so hatte sie doch insofern nicht den Charakter einer Hungermilch, als sie ganz normalen Trockensubstanzgehalt zeigte, auch als die produzierte Menge auf $^1/_7$ der normalen herab ging, was wohl der erzwungenen Wasseraufnahme zuzuschreiben ist.

Das Ergebnis der beschriebenen Versuche kann man wie folgt zusammenfassen:

1. Der Citronensäuregehalt der Ziegenmilch ist von dem der Kuhmilch nicht wesentlich verschieden; er beträgt bei dem gewöhnlichen Futter der Ziege 1 bis 1.5 g pro Liter.

Der Gehalt der Milch ist auch bei einem und demselben Futter ziemlichen Schwankungen unterworfen; auf gleichen Trockensubstanzgehalt bezogen treten diese Schwankungen stärker zu Tage; in Prozenten der Trockensubstanz schwankt diese Menge um das Doppelte.

2. Die Citronensäure der Milch stammt nicht aus der Citronensäure oder von anderen organischen Säuren, welche im Futter (Heu, Rüben etc.) allenfalls enthalten sind. Denn a) dieselbe ist, wenn auch in geringerer Menge, auch in der Frauenmilch enthalten; b) steigende Gaben von Citronensäure, welche bis zum 40 fachen der in der Milch ausgeschiedenen Menge gehen, bewirken bei Heufütterung keine Zunahme der gewöhnlich vorhandenen Menge; c) auch bei ausschliesslicher Fütterung mit Brot, Weizen- oder Erbsenmehl, welche sicherlich frei von Citronensäure sind, enthält die Milch normale Mengen dieser Säure; d) auch die im Hungerzustande oder wenigstens die bei sehr beschränkter Nahrungszufuhr produzierte Milch zeigt keinen verminderten Citronensäuregehalt.

3. Die Citronensäure der Milch stammt nicht aus der im Darm des Pflanzenfressers durch einen Gärungsvorgang gelösten Cellulose, resp. aus den hierbei entstehenden organischen Säuren; dies ergiebt sich a) ebenfalls aus dem Gehalt der Frauenmilch an dieser Säure; b) aus dem normalen Gehalt der Ziegenmilch bei Fütterung mit Brod, Weizen — oder Erbsenmehl; c) aus der gleichen Beschaffenheit der im Hungerzustande produzierten Milch.

Wenn die vorliegenden Versuche auch keine bestimmte Beantwortung der Frage über den Ursprung der Citronensäure in der Milch ergeben, so lässt sich aus ihnen doch das Eine

folgern, dass man es allem Anscheine nach in der Citronensäure mit einem spezifischen Milchbestandteile zu thun hat, welcher ebenso wie das Kaseïn, die Glyceride der flüchtigen Fettsäuren im Milchfett, und wie der Milchzucker ein Produkt der Milchdrüse ist, von welchen Produkten und insbesondere vom Milchzucker, zur Zeit mit Sicherheit auch noch nicht erkannt ist, aus welchen Nahrungs- oder Körperbestandteilen sie gebildet werden. Ebenso wie der Fleischfresser bei kohlehydratfreier Nahrung Milchzucker produziert und der Pflanzenfresser im Hungerzustande Milchzucker in der Milch ausscheidet, solange er überhaupt Milch giebt, ebenso findet man in der Hungermilch der Ziege Citronensäure, welche ebenso wie der Milchzucker der Hungermilch aus eigentlicher Körpersubstanz oder aus einem aufgespeicherten Kohlehydrat gebildet sein kann. Man wird also erst, wenn die Entstehung des Milchzuckers klar gelegt sein wird, was für den Milchzucker, welcher in 50 mal so grosser Menge in der Milch enthalten ist, viel leichter durchführbar ist, einen Einblick in die Verhältnisse der Citronensäure-Neubildung aus anderen Bestandteilen der Nahrung oder Körpersubstanz gewinnen.

Vorliegende Arbeit wurde im Laboratorium der landwirtschaftlichen Central-Versuchs-Station München unter Leitung des Herrn Professor Dr. Soxhlet ausgeführt, dem ich für seine vielfache Anregung und Unterstützung den aufrichtigsten Dank ausspreche.